

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平9-504273

(43)公表日 平成9年(1997)4月28日

(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	序内整理番号	F I
C 07 K 17/02		9356-4H	C 07 K 17/02
A 61 K 38/00	ADY	7433-4C	A 61 K 47/48
47/48		9356-4H	C 07 K 14/16
C 07 K 14/16		9051-4C	A 61 K 37/02

Z

ADY

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 48 頁)

(21) 出願番号	特願平7-509049
(86) (22) 出願日	平成6年(1994)9月13日
(85) 翻訳文提出日	平成8年(1996)3月13日
(86) 國際出願番号	PCT/GB94/01992
(87) 國際公開番号	WO95/07929 Equivalent to this Prior Art
(87) 國際公開日	平成7年(1995)3月23日
(31) 優先権主張番号	9318901.7
(32) 優先日	1993年9月13日
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)

(71) 出願人	アルメル ソシエテ アノニム ルクセンブルグ国 エル7307, スタンセル, ル パッセ, 50番
(72) 発明者	サバティエ, ジャン マルク フランス国 シャトーヌフ・ド ルージュ 13790, アレ デ アルジェラス, 12番
(72) 発明者	ベンジワード, アブデラジズ フランス国 カシャン 94230, ル ド コマンダン マルシャン, 14番
(74) 代理人	弁理士 久保田 藤郎 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HIVに対して使用するための多分岐ペプチド構築物

(57) 【要約】

HIV-1のgp120タンパク質のV3ループから誘導されるペプチドから形成され、0から4個のアミノ酸が先行しており、2から4個のアミノ酸が後に続いているコンセンサス配列G P G Rを含有し、好ましくはG P G Rの直前の3個のアミノ酸中にIを含有しておらず、そして最も好ましくはG P G R A Fである多分岐ペプチド構築物はレセプター親和性の増強を示し、細胞と細胞の融合を防止する。これら構築物は、直接的なウイルス抑制効果を有している。これら構築物は、同じペプチド配列が数倍存在しているので、これらのM B P Cは、HIV-1及びHIV-2の幾つかの株のウイルスエンベロープ/細胞膜融合及び感染細胞膜/非感染細胞膜融合の種々の段階をインピトロで中和することができる。注目すべきは、これら構築物はリンパ球及びマクロファージに対してはCD4レセプターを、結腸上皮細胞に対してはGalCerレセプターの両方を遮断するのに有効である。これらの結果は、HIV-1及びHIV-2感染の治療において使用できる可能性を開くものである。

【特許請求の範囲】

1. 2から64個までのペプチドが結合しているコアマトリックスを含む多分岐ペプチド構築物であって、その際に記載各ペプチドは0から4個までのアミノ酸残基が先行しており、2から4個までのアミノ酸残基が後に続いているアミノ酸配列G P G Rを含んでいるが、本質的にアミノ酸配列I G P G R又はI X X G P G R（式中、Xはアミノ酸残基である）を有していない多分岐ペプチド構築物。

2. コアマトリックスに結合した4から32個までのペプチドが存在している請求項1に記載のペプチド構築物。

3. 各ペプチドが同一である請求項1又は2に記載のペプチド構築物。

4. 各ペプチドがG P G R A Fである請求項1又は請求項2に記載のペプチド構築物。

5. 8又は16個のペプチドG P G R A Fが存在している請求項4に記載のペプチド構築物。

6. コアマトリックスがリジン残基を含むものである請求項1～5のいずれか1項に記載のペプチド構築物。

7. コアマトリックスとペプチドの間にスペーサーが存在している請求項1～6のいずれか1項に記載のペプチド構築物。

8. ペプチドがペプチド類似体である請求項1に記載のペプチド構築物。

9. すべてのペプチド又はいくつかのペプチドが1個又は複数個の右旋性アミノ酸残基を含んでいる請求項1に記載のペプチド構築物。

10. H I Vウイルスの表面エンベロープ糖タンパク質gp120のV3ループから誘導される2から64個までのペプチドが結合してい

るコアマトリックスを含む多分岐ペプチド構築物であって、該多分岐ペプチド構築物は 10^{-4} モル未満の血清濃度で非免疫原性であり、結合したCD4⁺/GalCer⁻及びCD4⁻/GalCer⁺細胞の両方でH I Vウイルスの感染性を阻止できる多分岐ペプチド構築物。

11. 請求項1～10のいずれか1項に記載の多分岐ペプチド構築物を製薬的に許容可能な希釈剤又は担体と混合して含んでいる医薬品。

12. 各ペプチドは0から4個のアミノ酸残基が先行しており、2から4個のアミノ酸残基が後に続いているアミノ酸配列G P G Rを含んでいる、2から64個までのペプチドが結合しているコアマトリックスを含む多分岐ペプチド構築物のH I V感染治療用の医薬品を製造するための用途。

13. 各ペプチドは0から4個のアミノ酸残基が先行しており、2から4個のアミノ酸残基が後に続いているアミノ酸配列G P G Rを含んでいる、2から64個までのペプチドが結合しているコアマトリックスを含む多分岐ペプチド構築物を患者に投与することを含むH I V感染の治療方法。

14. 請求項1～10のいずれか1項に記載の多分岐ペプチド構築物を患者に投与することを含むH I V感染の治療方法。

15. 請求項11に記載の医薬品を患者に投与することを含むH I V感染の治療方法。

16. 各ペプチドは0から4個のアミノ酸残基が先行しており、2から4個のアミノ酸残基が後に続いているアミノ酸配列G P G Rを含んでいるが、本質的にアミノ酸配列I G P G R又はI X X G P G R（式中、Xはアミノ酸残基である）を有していない、2から64個までのペプチドが結合しているコアマトリックスを含む多分岐ペプチド構築物の製造方法において、樹脂上でペプチド鎖を固相で段階的に延長し、続いて該樹脂から多分岐ペプチド構築物を開裂させることを特徴とする方法。

17. 樹脂が4-オキシメチルフェニルアセトアミドメチルコポリ（スチレン-1%ジビニルベンゼン）である請求項16に記載の方法。

18. ヒドロキシベンゾトリアゾール活性エステル（Boc-アミノ酸-O Bt）との系統的二重カップリングを含むBoc/ベンジル法を使用する請求項16又は請求項17に記載の方法。

19. 樹脂からの開裂が無水フッ化水素を用いて0℃で実施される請求項16～18のいずれか1項に記載の方法。

20. 製造されるペプチド構築物が、コアマトリックスに結合した4から32個までのペプチドが存在している構築物である請求項16～19のいずれか1項に

記載の方法。

21. 製造されるペプチド構築物が、各ペプチドが同一である構築物である請求項16～20のいずれか1項に記載の方法。

22. 製造されるペプチド構築物が、各ペプチドがGPGRAFである構築物である請求項16～21のいずれか1項に記載の方法。

23. 製造されるペプチド構築物が、8個又は16個のペプチドGPGRAFが存在している構築物である請求項22に記載の方法。

24. 製造されるペプチド構築物が、コアマトリックスがリジン残基を含んでいる構築物である請求項16～23のいずれか1項に記載の方法。

25. 製造されるペプチド構築物が、コアマトリックスとペプチドの間にスペーサーが存在している構築物である請求項16～24のいずれか1項に記載の方法。

26. 製造されるペプチド構築物が、ペプチドがペプチド類似体である構築物である請求項16～19のいずれか1項に記載の方法。

27. 製造されるペプチド構築物が、すべてのペプチド又はいくつかのペプチドに1個又は複数個の右旋性アミノ酸残基を含んでいる構築物である請求項16～19のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】**HIVに対して使用するための多分岐ペプチド構築物****発明の背景**

ヒト免疫不全ウイルス（HIV）は、恐らく後天性免疫不全症候群（エイズ）の病原因学的作用物である。HIVは種々の細胞タイプに持続的な感染をもたらす。細胞の多くは細胞表面の結合部位として抗原、CD4レセプターを発現する。このような細胞では、細胞感染の第1段階は、細胞のCD4表面抗原とHIVの外部エンベロープ糖タンパク質との結合によるウイルス結合で示される。この結合の後にウイルスエンベロープと標的細胞膜の融合及び内在化に係わる一連の現象が続き、これによって細胞が感染する。次に、HIV感染細胞は他の細胞を感染させ、合胞体（巨大多核細胞）を形成することができる。HIV-1感染細胞と非感染CD4+細胞（CD4レセプターを有する細胞）間の合胞体形成はCD4レセプターとHIV表面エンベロープ糖タンパク質間の相互作用に係わっている。この過程は可溶性CD4、抗CD4及び抗V3抗体によって阻止される。

インビボ(*in vivo*)で細胞から細胞へのウイルス拡散に関する細胞融合過程は血漿中和抗体を使えないようにし、リンパ球枯渇によって既に損傷した免疫系からウイルスを脱出させる。HIVによって活性化されたBリンパ球は異なる抗体集団を産生させる。抗体のなかにはgp120-CD4の相互作用を妨げないで、膜融合、即ち細胞感染に関する過程を阻止するものもある。これらの抗体は主としてエンベロープ糖タンパク質V3ループに対して向けられている。

種々のHIV-1単離体でのV3ループの可変性が非常に高いため、抗V3抗体は一般的に、抗体を産生させた単離体を中和するにすぎない。それ故、中和は当該単離体に限定され、そして単離体特異的と称される。これらの抗体は細胞融合阻止に関して有効であり、細胞-ウイルス結合に対する活性はない。

V3ループ関連ペプチドによってHIV感染を阻止する幾つかの試みがなされており、このようなペプチドの有効性に関する問題が提起されている。例えば、ドウロッシ（De Rossi）等[Virology, 184、187-196(1991年)]は或るV3ペプチドがウイルス感染を高めることを見出した。V3ループから得られる環状又は非

環状の他の合成ペプチドは細胞融合の重要な段階で無効であった。それ故、ウイルス単離体と関係のないウイルス-細胞融合や細胞対細胞融合を阻止できるアンタゴニストペプチドは開発されていない。

更に最近では、幾つかの研究によってHIV-1及びHIV-2の両者についてCD4と無関係の細胞感染経路が証明されており、少なくとも1つの別のウイルスレセプターの存在が示唆されている。これらの推定上の非CD4 HIVレセプターのうちの1つが最近CD4-脳由来細胞及び結腸上皮細胞で同定された。

このレセプターは中性糖タンパク質であり、ガラクトシルセラミド(GalCer)と呼ばれる。脳や腸のCD4-/GalCer+細胞のHIV感染によってこれらの器官におけるHIV関連疾患の幾つかを説明することができる。更に、或る粘膜上皮細胞の頂部面にGalCerが存在すると性交中にウイルスの侵入を促進する可能性がある。V3ループから誘導されたペプチドはGalCerレセプターを阻止する能力が未だ明らかにされていない。

これらの問題の幾つかに応えて、担体を使用しない抗原を開発するために、ポリマー中でリジン骨格を使用する放射状に枝分かれし

た系がジェイ・ピー・タム (J. P. Tam) [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5409-5413(1988年)]によって使用された。これらの抗原は種々の疾病に対するワクチンを産生させるように設計された。特に、HIV感染に対するワクチンを産生させる抗原はPCT出願第WO93/03766号にタムが記載しており、そして本質的に配列IGPGR(アミノ酸に関するIUPAC協定の一文字表記)を含み、有用な免疫応答を発揮するのに有効な配列は11個のアミノ酸長の配列である。同上の13頁、29-31行。しかしながら、このような抗原は疾病に対する可能性のある直接的な治療方法と考えられているのではなくて、身体の免疫学的応答を誘発するように意図されている。

発明の要約

本発明にはHIV感染患者を治療するための方法及びペプチド構築物とその製法が含まれる。本発明の方法によれば、治療投与用の多分岐ペプチド構築物は2から64個までのペプチドと結合したコアマトリックスを含み、上記の各ペプチド

は0から4個までのアミノ酸残基が先行しており、2から4個までのアミノ酸残基が後に続いているアミノ酸配列G P G R (Gly Pro Gly Arg)を含んでいる。

図面

図1は、H I VとC D 4⁺又はC D 4⁻細胞について提案される結合メカニズムである。

図2は、3つの異なるH I V株に関してヒト末梢血リンパ球 (P B L) の感染に与える多分枝ペプチド構築物 (M B P C) の効果の試験結果を示したものであり、3つの異なるM B P Cに対するp 24の量 (pg/ml) 又は逆転写酵素 (R T) 活性をプロットしており、1はなし；2は[G P G R A F]₈-多リジン核 (M L C) ; 3は[R

K S I H I G P G R A F Y T]₄-M L C; 4は[P P Y V E P T T T Q C]₄-M L Cである。

図3は、ヒトマクロファージ感染に対するM B P Cの試験結果であり、M B P Cをp 24の量 (pg/ml) に対してプロットしている。5つの異なるM B P Cを使用しており、1はなし；2は[G P G R A F]₈-M L C；3は[G P G R A F]₈-M L C；4は[G P G (R) A F]₈-M L C；5は[R K S I H I G P G R A F Y T]₄-M L C；及び6は[P P Y V E P T T T Q C]₄-M L Cである。

図4Aは、M B P Cなしで感染させた培養物における合胞体形成を示している。

図4Bは、[G P G R A F]₈-M L Cで処理したマクロファージでは合胞体が形成されていないことを示している。

図5Aは、Gal Cerレセプターを介したヒト上皮細胞感染に与えるM B P Cの効果を示す。

図5Bは、Gal Cerレセプターに対するgp120の結合を阻止するM B P Cの能力を示す。

図6A、6B、7A、7B及び7Cは全て、より長いM B P Cで免疫化したウサギ血清と比較したとき、短いM B P Cで免疫化したウサギ血清は相対的に活性がないことを示している。

発明の詳細な説明

I 構造

本発明は、HIV感染並びにHIV感染の拡散及び拡大を阻止できる多分枝ペプチド構築物(MBPC)に関するものである。MBPCはペプチドが共有結合しているコアマトリックスを有している。コアマトリックスは天然(*in nature*)で枝分かれしており、好ましくはその各分枝が同一である樹枝状ポリマーである。このコアマト

リックスは、末端官能基を有する分子分枝が共有結合している少なくとも2つの官能基を有するコア分子に基づいている。適当なコア分子にはアンモニア又はエチレンジアミンが含まれる。適当な分子分枝には、コア分子上で重合化されているアクリル酸エステルモノマーが含まれる。このような分子は、コア分子から枝分かれしたモノマーの数に依存して種々の分枝数を提供するように創製することができる。2から64個の分岐、好ましくは4から16個の間の分岐を有するMBPCが本発明で使用されるように意図されている。

コアマトリックスを形成するために使用される代表的な例はリジンである。中心リジン残基を2個のリジン残基に、各々のカルボキシル基を介して中心リジン残基のアミノ基の1つに結合させる。これによって4個のアミノ基を持つ分子が提供され、これは4個のペプチドを有するMBPC用のコアマトリックスとなることができる。或いは、リジン残基のカルボキシル基を介して4個のリジン残基を中心リジンに結合しているリジン残基のアミノ基の1つに結合させることによって8個の分枝を有する分子を提供することができる。この分子は8個のペプチドを有するMBPC用のコアマトリックスとして役立つか、或いは8個のリジン残基を受け入れて16個のペプチドを有するMBPC用のコアマトリックスを形成することができる。容易に理解されるように、より大きいMBPC、例えば32個の分枝を有するMBPCを、必要に応じて同様に構築することができる。

ペプチドのC末端をコアマトリックスの各分岐と共有結合させてMBPCを形成させる。これらのペプチドは、好ましくは同一であることができ、又は互いに異なっていることができる。得られた分子は表面のペプチド集団と、表面に出ず

、それ故抗原とならない内部コアマトリックスを有する。本明細書で意図されているペプチド

と異なるペプチドを有する類似構造の例についてはジェイ・ピー・タム[Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 5409-5413(1988年)]並びにタムに付与された米国特許第5229490号及びそこで引用された参考文献を参照されたい。

スペーサーは、所望の場合、ペプチドとコアマトリックスの間に含めることができる。最初のリジン残基のカルボキシル基は遊離のままであるか、アミド化されているか又は β -アラニン若しくは別の封鎖化合物と結合していることができる。

ペプチドにはD又はL-アミノ酸残基を含めることができる。Dアミノ酸の方がペプチダーゼによって切断され難いのでインビボではより長く持続するが、Lアミノ酸は、以下で考察するように、より良い活性を有している。

更に、ペプチド類似体、即ちペプチドの炭素骨格を使用しているが-CO-NH-ペプチド結合を有していない合成構築物をペプチドの代わりに使用することができる。かくして、本明細書でペプチドと言うときには、ペプチド類似体も含めるように考えていると理解すべきである。ペプチド類似体の方がペプチダーゼに対して耐性であり、そしてインビボでより長く持続すると考えられる。

本発明のM B P CにはH I V-1ウイルスの表面エンベロープ糖タンパク質gp 120のV3ループから誘導されるペプチドが含まれ、そして該ペプチドから得られるコンセンサスアミノ酸配列G P G R (I U P A Cの一文字アミノ酸表記、即ちGly-Pro-Gly-Arg) が含まれる。上記M B P Cは種々の細胞タイプのヒト細胞培養物中でH I V感染を阻止するのに有効である。この阻止はウイルス株には関係がなく、H I V-2株に対してさえ有効であると思われる。かくして、上記M B P Cは全く驚くべき治療特性を有している。

対応するモノマーペプチドは治療効果を有していないことに注目

すべきである。この差は、コアマトリックスがペプチドのコンホーメーションを変化させるために生じると思われる。特異的に、かつ予想されなかつたことに、

G P G R モノマーがコアマトリックスに結合しているとき、ペプチド中のG P G R の後の2個のアミノ酸が折り曲がることが見出された。それ故、コアマトリックスに結合したペプチド中のG P G R の後に続く少なくとも2個のアミノ酸残基が存在することが好ましい。しかしながら、ペプチドが長すぎる場合、M B P C は抗原性となるので、G P G R 配列の後に4個より多いアミノ酸を有し、該配列の前に4個より多いアミノ酸を有していることは望ましくない。それ故、ペプチドは12個もしくはそれ以下のアミノ酸を有しているであろう。

H I V - 1 及び H I V - 2 レトロウイルスによる感染の阻止に活性を示す特定のM B P C には以下のものが含まれ、これらをアミノ酸のI U P A C 表記法を使用して記載する。

表1 代表的なM B P C

M B P C . 1 : (G P G R A F Y)₈-(K)₄-(K)₂-K- β A-OH 又は
(G P G R A F Y)₈-(K)₄-(K)₂-K- β A-NH₂

M B P C . 3 : (G P G R A F)₈-(K)₄-(K)₂-K- β A-OH 又は
(G P G R A F)₈-(K)₄-(K)₂-K- β A-NH₂

M B P C . 12 : (G P G R A F)₁₆-(K)₈-(K)₄-(K)₂-K- β A-OH
又は (G P G R A F)₁₆-(K)₈-(K)₄-(K)₂-K- β A-NH₂

β -アラニンに接続する上記で示したOH末端は、そのカルボキシル基を示し、アミノ基はリジン残基のカルボキシル基と結合している。NH₂末端は β -アラニンのカルボキシル基が修飾されてカルボキサミド末端を形成していることを示し、 β -アラニンは、そのアミノ基がリジン残基のカルボキシル基と結合している。以下に

記載する実施例では、OH体を使用した。

所望の治療効果を有するためにペプチドはコンセンサス配列G P G R を含有すべきであるが、例えばI G P G R 又はI X X G P G R (式中、Xは任意のアミノ酸残基である) のように、G P G R の前にイソロイシンのコンホーメーション配列が含有されたり、V 3 ループからイソロイシンのコンホーメーション配列が含有されたりすると、I G P G R 配列を含有するペプチドが12個又はそれより少な

いアミノ酸残基のものであるとき、M B P Cが治療処置として殆ど有効でなくなるか、又は無効になることが見出されているので、本発明で使用するには好ましくない。G P G Rに先行する3個のアミノ酸のなかにイソロイシン(I)が存在している配列は比較的保持(*conserve*)されている配列であり、H I Vゲノムの約98%に見られるが、驚くべきことに、望ましくないことが発見された。

I G P G R又はI X X G P G R配列を含有するM B P Cは好ましくないにも拘わらず、このペプチド配列を有するM B P Cは、複製されたペプチドが12個のアミノ酸残基より長い場合、合胞体の形成を阻止することが見出された。例えば、合胞体の形成を阻止するこのようなより大きいM B P Cの1つは、4つに枝分かれしたM B P Cの各分枝に結合したペプチドがR K S I H I G P G R A F Y TであるM B P Cである。しかしながら、このような大きいM B P Cは、このような大きい分子が、たとえ低濃度(10^{-4} M)であっても抗体を誘発し、H I V感染患者の抗体によって認識され、阻止されることが示されており、そしてこれら両方のためにH I V感染患者に長期間に亘って上記M B P Cを使用できなくなることが示されているので、望ましくない。これらのM B P Cはまた、それらの有効濃度に近い濃度で細胞培養物に対して毒性を示す。更に、これらM B P Cの大きさのためにM B P Cの構築が困難、かつ高価となり、プロ

テアーゼ分解に対して一層感受性となる。

それ故、本発明は2から64個まで、好ましくは4から32個までのペプチドが結合しているコアマトリックスを含むM B P Cを提供し、その際各ペプチドは0から4個までのアミノ酸残基で先行され、2から4個までのアミノ酸残基で後続されている配列G P G Rを含んでいる。好ましくは、該ペプチドはI G P G R又はI X X G P G R(式中、Xはアミノ酸残基である)のような、Gの前の3個のアミノ酸の中にIの配列を含むべきでない。好ましくは、8又は16に枝分かれしたコアマトリックスに結合したペプチドはG P G R A Fである。しかしながら、A Fはペプチダーゼの影響を受け易く、それ故インビボで分解し易いように思われる所以、置換されたアミノ酸が同一の特性を有する場合、A Fを置換することは可能であり、望ましいと考えられる。

II M B P Cの調製

M B P C構造の製造、即ちペプチドが結合している技分かれしたコア（これは、これまで多抗原性ペプチド（M A P）と称されていた）の製造は当該技術分野で既に知られている。タム等、J. Immun. 148、914-920(1992年)及びワン(Wang)等、Science、254、285-288(1991年)参照。好ましくは、少量（1キログラム未満）では、固相法を使用してM B P Cを得る。ペプチド鎖の段階的組立ては4-(オキシメチル)-フェニルアセトアミドメチルコポリ(スチレン-1%ジビニルベンゼン)上で自動的に実施することができる。ヒドロキシベンゾトリアゾール活性エステル(Boc-アミノ酸-OEt)との系統的ダブルカップリングスキームを含むBoc/ベンジル法を使用することができる。樹脂からの最終分離は無水フッ化水素を用いて実施する(0°Cで1時間)ことができる。次に、M B P Cをジェ

チルエーテルで洗浄し、水に溶解する。凍結乾燥後、M B P Cを0.1N酢酸で平衡化したP 2又はG15タイプの分子ろ過カラムで予め精製することができる。次に、溶出フラクションを回収することができる。精製段階は、C₈又はC₁₈逆相HPLCを使用して達成される。M B P Cは、酸加水分解(6 N HCl、115°C、24時間)及びエレクトロスプレーマススペクトル法によるアミノ酸含量によって特徴を決定することができる。

III 治療効果及び用途

本発明は、2から64個まで、好ましくは4から32個までのペプチドが結合しているコアマトリックスを含むM B P Cを患者に投与するH I V感染の治療方法を提供し、その際各ペプチドは0から4個までのアミノ酸残基で先行され、2から4個までのアミノ酸残基で後続されている配列G P G Rを含んでいるが、好ましくは配列I G P G R又はI X X G P G R(式中、Xはアミノ酸残基である)ではない。M B P Cは、10⁻³ Mから10⁻⁷ Mの間、好ましくは約10⁻⁶ Mの血清値で投与すべきである。

本発明に従って製造されるM B P CはH I V感染とH I V誘発細胞変性効果の両方をインビトロで阻止し、そしてその結果宿主生物内のウイルス増殖及びウイルス拡散を阻止することができる。

本発明に従って製造されるM B P Cはウイルスエンベロープー細胞膜融合段階、そしてまた合胞体形成に必須の感染細胞膜—非感染細胞膜の融合段階も中和し、これらの段階はいずれも細胞感染、宿主生物内でのウイルス増殖及びウイルス拡散に不可欠であると考えられる。M B P Cは、明らかにCD 4 レセプターのCDR 3 ドメインに結合することによって、H I Vの89. 6株を含有しているリンパ球やマクロファージのような細胞に存在するCD 4 レセプターを遮断することができる。

かくして、本発明のM B P CはH I V-1とH I V-2によって誘発される合胞体の形成を遮断し、そしてヒト末梢血リンパ球（P B L）やマクロファージの感染を阻止する。このような遮断は細胞が他の抗原又は分裂誘発因子により活性化される能力を喪失させない、即ちリンパ球の機能性はM B P Cによって保持される。

リンパ球の機能性の保持がなされるならば、人為的エイズの潜在的な問題は本発明で回避される。それ故、本発明のM B P Cが、T細胞を活性化するレセプターではなく、融合レセプターに結合していることは、H I Vに対するこれまでのいかなる治療法を超える1つの主要な進歩である。

H I V感染の予防に加えて、本発明のM B P Cは処置前に感染している細胞内のH I V産生を抑制することが示されている。

本発明のM B P C、そして特に、好ましい $8 \times G P G R A F$ 及び $16 \times G P G R A F$ M B P Cの全く予想されなかつた1つの特性は、これらM B P CがH I VのレセプターであるGalCerレセプターに結合する能力を示したことである。このレセプターは結腸上皮細胞及び中枢神経系CD 4-細胞中に存在することが示されている。この結合によって、M B P Cは関連の少ないH I V-1とH I V-2の両単離体によるヒト腸細胞の感染を阻止する。

本発明のM B P Cのもう1つの利点は、これらM B P Cが齧歯類、ウサギ及びサルで高投与量で非毒性であり、そしてそれ故治療的に使用されたとき、現在の多数のエイズ治療法とは対照的に、患者に危害を与えないことが見出されたことである。

本発明のM B P Cのもう1つの利点は、これらM B P Cが $10^{-4} M$ 又はそれ未満

の濃度で免疫原性でなく、それ故、V3ループから誘導されたペプチド又はそれらの構築物に関する全ての先行技術の方

法とは異なって、ワクチンでないことである。MBPCの免疫原性欠如は、免疫反応によってMBPCを阻止するか又は破壊する抗体が生じるので有利である。上記したRKSIHIGPGRAFYTのような免疫原性MBPCは、同一の個体に2、3回しか使用できず、そしてその後このMBPCは無効になるであろう。

A CD4レセプターの遮断

実験データは、本発明のMBPC、特にMBPC.3及びMBPC.12による、CD4⁺細胞のHIV感染過程に与える特異的な阻止効果及びHIV-1及びHIV-2誘発性合胞体形成の総合的な遮断を証明している。インビトロで阻止効果が観察されたMBPC濃度はMBPC.3及びMBPC.12で約10⁻⁶M、他のMBPCではより高い濃度である。中和は試験した全てのHIV株、即ちHIV-1のMN、Lai、NDK及び89.6並びにHIV-2のRodで観察された。対照的に、MBPCで使用した個々のペプチドフラグメントは、非常に高濃度、例えば5×10⁻⁴Mでさえ、合胞体形成阻止に対して不活性である。

かくしてMBPCは、細胞感染に必要な結合後の現象、即ち融合段階に関与し、そしてV3ループが相違している関連の少ないHIV-1及びHIV-2単離体によって使用される細胞分子と相互作用することができる。この仮定上のV3結合部位の良好な候補はCD4のV1領域のCDR3ドメインである。その理由は、i) この領域に特異的な抗CD4抗体(例えば、13B8-2)がHIV-1感染中の融合過程を遮断し、ii) CDR3由来の合成ペプチドが融合アッセイで或る程度の阻止効果を有しており、そしてiii) MBPCがCD4のCDR3ドメインに対応する合成ペプチドを認識するからである。

本発明のMBPCはウイルスエンベロープの結合を変化させることなくリンパ球に結合し(CDR2ドメインを介して)、そして一方HIV感染効果を防止する。MBPCは可溶性CD4にも結合する。それ故、MBPC結合は可溶性CD

4の存在下で阻止される。

自然環境下での領域特異的な抗CD4抗体とCD4レセプター間の相互作用に与える本発明のMBPCの効果を試験した。マクロファージで発現されたCD4に対する抗CDR3モノクローナル抗体(MAb)13B8-2の本来的(*in situ*)結合は本発明のMBPCの存在下で劇的に、かつ特異的に低下した。gp120結合部位を認識する抗CD4MAb(Leu3a及びOKT4aMAb)を含む他の抗CD4MAbの結合は、MBPCの非存在下と存在下で同一であった。これらのデータは、MBPCがCD4のCDR3領域に結合し、その結果、少なくとも1部、gp120V3ループとCD4のこの領域間の相互作用を遮断することによって作用することを証明している。

HIV-1のV3ループは、HIV-1とその標的細胞間の融合過程の重要な決定基であると考えられているにも拘わらず、本発明までは未だこの特性を治療的に使用することは可能になっていなかった。この主な理由は、V3がHIV-1単離体間で高度の多様性を示す高可変領域であるということである。抗V3中和抗体は一般的にタイプ特異性であり、そして最良の場合でも密接に関連した単離体しか中和することができない。本発明のMBPCは、細胞を標的とし、ウイルス決定基を標的としないので、該MBPCはエンベロープ可変性に固有の問題を迂回する。それ故、本発明で使用されるMBPCは、HIV-1 V3ループのコンセンサス配列から誘導されるけれども、非常に多様性のHIV-1 (NDK) を含む種々のHIV-1株、そして更には関連のないHIV-2 ROD株も中和することができる。驚くべきことに、本発明のMBPCは、AZ

Tに耐性の株、J-1を含む初期HIV-1単離体、即ち患者から直接集めた単離体による感染を阻止することも見出された。

以下の実施例は、HIV感染に関して本発明のMBPCの有効性、利用性及び用途の広範さ、並びにこれらMBPCとCD4⁺リンパ球及びマクロファージとの結合及び融合を説明するものであって、限定を意図するものではない。

実施例1 合胞体形成遮断

細胞は、5%ウシ胎児血清、1%グルタミン、1%ストレプトマイシン-ペニ

シリンを補充したRPMI 1640培地(スコットランドアービンのGibco)中、5% CO₂を有する湿潤化霧囲気下で培養した。CEM又はC8166細胞はHIV-1 Lai、HIV-2 Rod又はHIV-1 MNでそれぞれ長期に感染させた。感染細胞 (1×10^4 個) は種々の濃度のMBPCと共に96ウェルのプレート中で2時間インキュベートした。次に、感染していないMolt-4細胞 (4×10^4 個) を10 μ lの培地に加えた。合胞体は37°Cで18時間後に計数した。結果は下記の表に示す。

表2 合胞体形成

<u>MBPC</u>	<u>MBPC濃度</u>	<u>HIV-1MN</u>	<u>HIV-1Lai</u>	<u>HIV-2Rod</u>
MBPC.3	5×10^{-6} M	-	-	-
	10^{-6} M	+	+	-
	10^{-7} M	+++	++++	+
MBPC.5	5×10^{-6} M	-	-	-
	10^{-6} M	++	+	-
	10^{-7} M	+++	+++	+
MBPC.4	5×10^{-6} M	+++	+++	++++
	10^{-6} M	++++	++++	++++
	10^{-7} M	++	+++	+++
Mono.3	10^{-5} M	+++	+++	+++
	10^{-6} M	+++	+++	+++
	10^{-7} M	+++	+++	+++

MBPC.4は(I G P G R A F)₄-(K)₂-K-βA-OHである。Mono.3はヘキサペプチドGPGRAFであり、MBPC.5はテトラデカペプチドMBPC(RKS I H I G P G R A F Y T)₄-(K)₂-K-βA-OHである。MBPC.3は上記で述べたとおりである。合胞体の存在は、計数した量に概ね比例して配分した+印で示す。

MBPC.3は、HIVによって誘発された合胞体形成に対して約 10^{-6} Mの濃度でインビトロ阻止効果を示し、そしてMBPC.5は僅かに高い濃度で阻止効果を示した。MBPC.12(結果は示していない)はMBPC.3の結果に類似した結果を示した。比較すると、モノマータイプMono.3は全体的に不活性であり、このことは 10^{-4} Mのより高い濃度のMono.3でも確認されている。

実施例2 PBLの感染防止

R T - 欠失 H I V - 1 (IIB) 単離体で長期感染させた 50×10^3 個の 8E5 細胞を、96 ウェルのプレート中で表示したペプチドの存在下で 150×10^3 個の フィトヘマグルチニン (PHA) 刺激ヒト末梢血リンパ球 (PBL) と共に培養した。使用した M B P C は、MLC と呼称されるコアリジンマトリックスに結合したペプチドとペプチド数によって記載する。この実験で使用したアミノ酸は全て右旋性であった。

M B P C の化学合成は上記したようにして固相技術で行った。ペプチド鎖は最適の t - ブチルオキシカルボニル / ベンジル化学を使用して 4 - (オキシメチル) - PAM 樹脂上で段階的に延長した。精製 M B P C のアミノ酸分析は推定されるアミノ酸比率と一致した。

[G P G R A F]₈ - MLC はエレクトロスプレー質量スペクトル法によって更に特徴化した (実験的 $M_r = 5672 \text{ Da}$)。

合胞体数はペプチドの継続的な存在下での 24 時間インキュベーション後に測定し、そしてこれらの結果は下記表 3 に示す。表中、+++ は、ウェル中に存在する合胞体数が未処理対照ウェルと類似していたことを示し、- はウェル中に合胞体が全く存在していないことを示し、± はウェル中に少数の合胞体がまれに存在していたことを示す。この試験での合胞体形成は抗 CD4 抗体 OKT4A (抗 CDR2) 及び 13B8-2 (抗 CDR3) によって遮断され、これまでの報告と一致した。コアリジン構造 (「MLC」と称する) 自体はこの試験で合胞体形成を誘発しなかった。毒性は MTT アッセイ (以下に記載する) か又はトリパンブルー排除技術のどちらかで評価した。

表3 MBPCによるHIV-1誘発細胞融合の阻止

ペプチド	濃度 (M)		
	5×10^{-7}	5×10^{-6}	5×10^{-5}
GPGRAF	+++	+++	+++
[GPGRAF] ₈ -MLC	±	-	-
[IGPGRAF] ₈ -MLC	+++	±	-
[GPGRA] ₈ -MLC	+++	+++	+++
[GPGR] ₈ -MLC	+++	+++	+++
[GPG(R) ₂ AF] ₈ -MLC	+++	-	毒性
[GPGRAF] ₈ -MLC _D	+++	+++	+++
[Ac-GPGRAF] ₈ -MLC	+++	+++	-
[RKS[HIGPGRAFY] ₄ -MLC	+++	-	毒性
[RKS[HKGPGRAFY] ₄ -MLC	+++	-	毒性
[RKS[HTGPGRAFY] ₄ -MLC	+++	-	毒性
RAFVTIGK	+++	+++	-

これらの実験条件下で、[G P G R A F]₈-MLCは 5×10^{-7} Mほどの低濃度で合胞体形成の著しい阻止を誘発し、一方対応するモノマーペプチドG P G R A Fは使用した濃度範囲 (5×10^{-5} M) で活性でなかった。N末端のアセチル化 ([A c - G P G R A F]₈-MLC) 、イソロイシン (I) 残基の付加 ([I G P G R A F]₈-MLC) 及びG P G R A F配列へのD-アミノ酸の導入によって活性が顕著に失われた。6個より少ない残基を有するMBPC（即ち、

[G P G R A]₈-MLC又は[G P G R]₈-MLC）並びに非関連配列を有するMBPCは細胞融合を阻止せず、コアマトリックスが生物学的活性に関与していないことを示していた。

[R K S I H I G P G R A F Y T]₄-MLCは 5×10^{-6} Mの濃度で合胞体形成を阻止することができた。G P G R A Fモチーフに先行するイソロイシン残基はHIV-1単離体のなかで高度に保持されているので、イソロイシンの代わりにリジン又はスレオニンを用いて2つの関連構築物を合成した。これら3つの構築物の抗融合活性に顕著な差異は見られなかった。しかしながら、[R K S I H I G P G R A F Y T]₄-MLC及びその誘導体は、 5×10^{-5} Mの濃度で使用したとき8E5細胞で毒性を幾らか誘発したので、ヒト治療法で使用するには望ましくないことに注目すべきである。

これらの結果に基づいて、より強力な抗HIV-MBPCは[G P G R A F]₈-MLCであるように思われた。別の試験で、この分子はHIV-1(LAI)、

HIV-1(NDK)又はHIV-2(ROD)で長期に感染させたTリンパ芽球様CEM細胞とHTLV形質転換MT-2細胞間の融合を阻止することもできた。

実施例3 リンパ球の機能性に与えるMBPCの効果

a) 抗原及び分裂誘発因子誘発細胞増殖に与えるMBPCの影響

3人の健常なHIV血清反応陰性ドナーから得た末梢血リンパ球(PBL)は、フィコール・ハイパク技術によってヘパリン添加血液から単離した。培地は1%グルタミン、1%抗生物質及び10%加熱不活性化ウシ胎児血清を補充した RPMI1640培地であった。細胞(10^5 個)は、抗原(カンジジン、PPD)又は分裂誘発因子(PHA)と共に又はこれらを用いないでMBPC(5×10^{-6} M)の存在下でインキュベートした。抗原又は分裂誘発因子で処理した細

胞は、1mCiの $[^3\text{H}]$ チミジンを8時間パルス投与した。次いで、細胞を採取しそしてDNA中の $[^3\text{H}]$ チミジン取込みを計数した。

b) 混合リンパ球応答(MLR)

このアッセイでは、3人の健常ドナーから得た末梢血リンパ球(105個)を、微量滴定プレートウェル中で種々の濃度のMBPCの存在下又は非存在下で200 μl の最終容量で10人の血清反応陰性ドナーの混合物から得た105個の細胞と共にインキュベートした。リンパ球混合物は6日目に1 μl の $[^3\text{H}]$ チミジンを8時間パルス投与した。細胞を採取し、DNA中への $[^3\text{H}]$ チミジン取込みをベータカウンターで計数した。結果は、最初の試験で述べたMBPC.5と共に下記表4に示す。

表4 PBL抗原及び分裂誘発因子誘発増殖
[³H]チミジン取込み(cpm)

	対 照	MBPC.3	MBPC.5
ドナー3			
PHA1	203000	162000	228000
PHA2	183000	154000	188000
PPD1	5900	3900	4000
PPD2	3200	3100	2400
Cand1	3900	3200	3700
Cand2	1700	1200	1100
ドナー2			
PHA1	115000	87000	115000
PHA2	112000	95000	111000
PPD1	38000	24000	24000
PPD2	33000	27000	26000
Cand1	28000	17000	15000
Cand2	13000	11000	9000
ドナー1			
PHA1	= = =	= = =	= = =
PHA2	= = =	= = =	= = =
PPD1	1200	1300	1300
PPD2	1500	3100	2100
Cand1	74000	87000	80000
Cand2	79000	100000	85000

細胞のチミジン取込みは、処理プレートと対照プレートで類似している。PBLの機能性が否定的な影響を受けていた場合、細胞再生産のマーカーであるチミジンの取込みはMBPC処理プレートでかなり増加したであろう。かくして、これらの結果は、PBLが抗原又は分裂誘発因子に応答する能力を失っているときに見られるように、PBLが増殖していないことを示している。

実施例4 ヒトPBLの感染に与えるMBPCの効果

末梢血リンパ球(PBL)を健常ドナーから取得し、フィトヘマグルチニンで刺激し、そして10%ウシ胎児血清及びインターロイキン-2を含有する RPMI 1640(完全培地)中で培養した。6×

10⁶個の細胞/mlの試料は、10⁻⁵Mの濃度の指示されたMBPCで処理するか又は処理しないかのどちらかであり、そしてMBPCを継続して存在させて HIV

—1又はHIV-2 (100TCD₅₀) に37°Cで1時間暴露した。完全に洗浄した後、PBLは10⁻⁵Mの対応するMBPCを有する完全培地中で培養した。感染状態は、RT活性を測定すること (HIV-1及びHIV-2単離体の両方について) によって、またHIV-1単離体の場合には、感染10日後にHIV-1 p24^{gag}測定 (Coulter kit、10pg/mlでカットする) によって評価した。使用したMBPC処理は次のとおりであった：1 なし；2 [GPGRAF]₈-MLC；3 [RKSIHIGPGRAFYT]₄-MLC；4 [PPPYVEPTTQCT]₄-MLC (非-HIV関連MBPC) (MLCはコアリジン構造を示す)。図2に示した結果は3つの別個の実験を表わす。使用したウイルス単離体の性質は、PCR (HIV-1対HIV-2単離体) で、HIV-1 (LAI) とHIV-1 (NDK) 間の区別に関してはRIAによって調べた。

[GPGRAF]₈-MLC及び[RKSIHIGPGRAFYT]₄-MLC処理は、培養上清液中の逆転写酵素 (RT) 活性の測定によって評価するとき、ウイルス子孫の產生遅延を一貫して生じさせた：感染後10日目及び13日目に、RT活性はMBPC処理試料では対照試料より90%以上も低かった。ペプチドはRTアッセイを妨げなかったので、上記の活性はMBPC誘発性のウイルス產生阻止と一致する。ウイルス產生後に培養上清液中のp24^{gag}濃度を測定したとき同様な結果が得られた。HIV-2感染の阻止については、[RKSIHIGPGRAFYT]₄-MLCは[GPGRAF]₈-MLCより能力が低かった。V3ループから得られるコンセンサス配列を含有していないMBPCはPBLの感染を阻止しなかった。

実施例5 マクロファージにおける合胞体形成のMBPC阻止

MBPCは、高度に細胞変性のマクロファージ向性単離体、HIV-1 (89.6) によるヒト原始マクロファージの感染を遮断する能力についても評価した。単核細胞は、フィコール・ハイパク密度分離によって単細胞に富む白血球泳動ユニットから単離した。マクロファージは10%ウシ胎児血清及び5%ヒトAB血清を補充したRPMI1640培地でプラスチックに付着させて精製した。付着細胞は、GM-CSF (1ng/ml) の存在下で5日間培養し、ヒトマクロファージマー

カー (Boehringer Mannheim、クローン25F9) について陽性であった。 5×10^5 個の細胞を、 5×10^{-5} M の濃度の指示されたMBPCで45分間処理し、そしてその後10,000TCID₅₀ のマクロファージ向性単離体HIV-1(89.6)に暴露した。使用したMBPCは次のとおりであった： 1 無し； 2 [GPGRAF]₈-MLC； 4 [GPG(R)_DAF]₈-MLC； 5 [RKSIHIGPGRAFYT]₄-MLC； 6 [PPPYYVEPTTTQC]₄-MLC、その際アミノ酸はD体であると記載しない限りL体である。完全に洗浄した後、細胞に再度培地を与える、そして感染4日後にHIV-1 p24^{gag} 産生及び合胞体形成について分析した。結果は、p24の量 (ng/ml) に対してMBPCをプロットして図3に示す。図3に示したように、ウェル当たりの相対的な合胞体数 (+++は阻止なし； ++は50%阻止； 土は>95%の阻止を示す) は p24^{gag} の濃度と相関関係にあった。

図4Aに示したマクロファージは未処理対照であり、感染培養物中の多数の合胞体の存在を示している。図4Bに100倍で示される、[GPGRAF]₈-MLCで予め処理したマクロファージは巨大細胞が非常に少ないことを示した。[RKSIHIGPGRAFYT]₄-MLC及び[GPGRAF]₈-MLCは、i) MBPCの

存在下で10,000TCID₅₀ のHIV-1(89.6)に暴露したマクロファージ培養物における可視性の細胞変性効果の大きな低下並びにii) 培養上清液におけるHIV-1 p24^{gag} 濃度及びRT活性の測定によって評価したとき、感染を阻止することができた。対照MBPCはHIV-1(89.6)によるマクロファージの感染率に顕著には影響を与えなかった。興味深いことに、[GPGRAF]₈-MLC_D (即ち、D-アミノ酸残基を有する[GPGRAF]₈-MLC) 及び [GPG(R)_DAF]₈-MLCは[GPGRAF]₈-MLCよりマクロファージ感染に対する活性が顕著に低かった。

B GalCer レセプター

本発明のMBPC、特にMBPC.3及びMBPC.12並びにこれらの誘導体は第2のレセプター、ガラクトシルセラミドレセプター (Harouse等、Science、253、320-323参照) にも結合し、そしてヒト結腸細胞に対するHIVの感染性を完

全に遮断する。対応するモノマーペプチドはこのレセプターに対して不活性である。

MBPC中でGPGRAFペプチドを使用して腸細胞のGalCer感染経路の全体的な遮断を得るために、MBPCの重合度は少なくとも8でなければならぬ。これは、GalCer認識に対するV3ループのコンホーメーション要求がCD4のCDR3ドメインへの結合に対する要求より厳格であることを示唆している。CDR3は酸性の領域（融合過程に必須であると報告されている87位にグルタミン酸残基を含んでいる）であり、そしてこの領域は多分静電的相互作用によってV3ループの塩基性アミノ酸と相互作用する。対照的に、gp120結合に関与することが知られているGalCerのガラクトースヘッド基は中性極性であるので、最適に相互作用するためにはV3構造で原子の別の空間配置を必要とする可能性がある。かく

して、CD4経路のHIV感染を遮断する治療法がGalCerレセプターとも作用することは驚くべきことである。

MBPCの活性は次のようにしてこの代替的感染経路に対して評価した： HT-29細胞（ 5×10^5 個の細胞）をMBPC（ 5×10^{-6} M）と共に45分間インキュベートし、その後100TCID₅₀のHIV-1(LAI)、HIV-1(NDK)又はHIV-2(ROD)に37°Cで1時間暴露した。残っている接種物を3連続トリプシン化で不活性化し、感染は次のようにして評価した：

- i) 培養上清液中のHIV-1 p24 ^{gag} (HIV-1単離体について) 及びRT活性 (HIV-1及びHIV-2単離体について) の直接測定；
- ii) ヒトPBLとの共培養。細胞は次のようにしてMBPCで処理した： 1 無し； 2 [GPGRAF]₈-MLC； 3 [GPGRAF]₈-MLC_D； 4 [GPG(R)_DAF]₈-MLC； 5 [GPGRAF]₁₆-MLC； 6 [RKS I H I GPGRAFY T]₄-MLC； 及び 7 [PPPYVEPTTTQC]₄-MLC、その際他に記載しない限りアミノ酸は全てL体である。HIV-1 (NDK)による感染に対応する図5Aに示した結果は別個の3つの実験の代表例であり、使用したMBPCはX軸の数字で示される。p24 ^{gag} (pg/ml) の濃度はPBLと

の共培養実験中に測定した（+++は感染10日後に $>10\text{ng}/\text{ml}$ ；++は感染13日後に $>1\text{ng}/\text{ml}$ ；+は感染16日後に $>1\text{ng}/\text{ml}$ ；-は感染1ヶ月後に検出可能なp24 ^{gag}なしを示す。）。HIV-1（LAI）及びHIV-2（ROD）で同様な結果が得られた。

同じMBPCによる別の実験で、GalCerに対するgp120の結合に与えるMBPCの効果を、高性能薄層クロマトグラフィー（HPTLC）結合アッセイを使用して分析した。MBPC (10^{-4}M) を

GalCerと共に室温で1時間予めインキュベートした。完全に洗浄した後、HPTLCプレートをHIV-1組換え体gp120 ($2.5\mu\text{g}/\text{ml}$)、続いてウサギ抗gp120及び¹²⁵I-ヤギ抗ウサギIgGと共にインキュベートした。これらのプレートをPBS中で洗浄し、アマーシャムハイパーフィルム (Amersham hyperfilm) MPに8時間暴露した。図5Bに示されるように、活性MBPCでHT-29細胞を処理すると、細胞はHIV-1（NDK単離体）による感染から保護された。この抗ウイルス効果は、活性MBPCがGalCerに対するgp120の結合を遮断する能力と相関関係があった。モノマーV3ペプチドも対照MBPCも抗ウイルス活性を示さず、GalCerに対するgp120の結合を阻止しなかった。

それ故、本発明は更に、各々がHIV-1ウイルスの表面エンベロープ糖タンパク質gp120のV3ループから誘導される2から64個（好ましくは4から32個）のペプチドが結合しているコアマトリックスを含むMBPCを提供し、このMBPCはCD4⁺/GalCer⁻及びCD4⁻/GalCer⁺細胞でHIVウイルスの感染性を阻止することができる。

C. 抗原性、毒性及び免疫原性

本発明のMBPCは、ヒトPBLに対してはインビトロで又は 10^{-3}M の濃度のMBPCを腹腔内、静脈内又は皮下的のいずれかで反復注入したマウスに対してはインビボで毒性でない。1mgのMBPCの反復投与量を腹腔内及び静脈内に投与したマウスは副作用を何も示さなかった。更に、5mg/kgの投与量を1回静注し、その後毎日皮下注射したサル (*macaca sylvana*) は30日後に毒性効果の徵候を何も示していなかった。更に、[GPGRAF]₈-MLCを注射したウサギ及

びマウスは抗G P G R A F 抗体の有意な力価をもたら

さず、ペプチドの各分枝のアミノ酸残基が10個未満であるM B P Cは意図された使用濃度の 10^{-3} M未満の濃度で免疫原性でないという概念と一致していた。更に、インビトロでは、P B Lは他の抗原又は分裂誘発因子によって活性化される能力を保持している。

1. 抗原性

M B P Cの免疫原性に関する酵素免疫検査法（エリザ法）

M B P C. 1、M B P C. 2及びモノマーV 3 コンセンサスペプチドを、H I V - 1⁺ 血清又はH I V - 1⁻ 血清に対する免疫反応性についてエリザ法で試験した。この試験で、M B P C. 2は(R K S I H I G P G R A F Y T)₄ - (K)₂ - K - β A - OHであり、M B P C. 1は(G P G R A F)₈ - (K)₄ - (K)₂ - K - β A - OHである。血清の陽性は先ず、血清／血漿中の抗H I V - 1 抗体を検出するためにNEWLAV-B L O T キット (Diagnostic Pasteur) を使用してウェスターんプロット分析で確認した。96 ウェルの微量滴定プレートを500ng／ウェルのペプチドで被覆した。飽和させ、洗浄した後、50 μ lのH I V - 1⁺ 血清 (1/100希釈) を37°Cで2 時間添加した。パーオキシダーゼ結合ブタ抗ウサギI p Gを用いて染色した。30個のH I V - 1 陽性血清及び3 個のH I V - 1 陰性血清を、北アメリカ人／ヨーロッパ人のコンセンサス(V3 Cons)配列から誘導されたV 3 ペプチド及びV 3 M B P Cに対してエリザ法で比較分析した。結果は下記表5に記載する。

30個のH I V - 1 陽性血清のうち、26個はV 3 Cons及びM B P C. 2と強く反応し、1 個は両ペプチドと弱く反応し、1 個はM B P C. 2と選択的に反応し、そして2 個の血清はこれらペプチドのいずれとも反応しなかった。

興味深いことに、M B P C. 1はH I V - 1 陽性血清のいずれとも

反応しなかった。M B P C. 2と比較するとき、M B P C. 1はH I V - 1 及びH I V - 2 感染の遮断で一層有効であり、毒性が少ないことが示された。M B P C. 1 がH I V - 1 陽性血清によって認識されないということは、このM B P Cが抗V

3抗体の中和活性を妨げ得ないことを示唆している可能性がある。それ故、これらは相乗的に作用してHIV-1感染を中和することができよう。

表5

血清番号	ウエスタンプロット HIV-1	エリザコンセンサス V3	500ngのペプチド/ウェル MBPC2	MBPC1
1	+	+++++	+++++	-
2	+	+++++	+++++	-
3	+	+++++	+++++	-
4	+	+++++	+++++	-
5	+	+++++	+++++	-
6	+	+++++	+++++	-
7	+	+++++	+++++	-
8	+	+++++	+++++	-
9	+	+++++	+++++	-
10	+	+++++	+++++	-
11	+	+++++	+++++	-
12	+	+++++	+++++	-
13	+	+++++	+++++	-
14	+	++	+++	-
15	+	+++++	+++++	-
16	+	+++++	+++++	-
17	+	+++++	+++++	-
18	+	+++++	+++++	-
19	+	+++++	+++++	-
20	+	-	-	-
21	+	+	+	-
22	+	-	-	-
23	+	-	+	-
24	+	+++++	+++++	-
25	+	+++++	+++++	-
26	+	+++++	+++++	-
27	+	+++++	+++++	-
28	+	+++++	+++++	-
29	+	+++++	+++++	-
30	+	+++++	+++++	-
31	-	-	-	-
32	-	-	-	-
33	-	-	-	-

2. 毒性

MTTアッセイ、即ち3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]2,5-ジフェニルテトラゾリウム ブロミドを使用する細胞生存性比色分析アッセイを使用して細胞の生存性に対するMBPCの効果を評価した。CEM又はC8166細胞（ 5×10^4 個）は、5%ウシ胎児血清、1%グルタミン、1%ストレプトマイシンペニシリンを補充した $200 \mu\text{l}$ の最終容量の RPMI 1640培地（スコットランドアービンのGibcoから入手可能）中5%CO₂を有する湿潤化雰囲気下96ウェルの微

量滴定プレート中種々の濃度のM B P Cの存在下で連續（15日）培養した。3乃至4日毎に、 $100\mu\text{l}$ の細胞懸濁物についてMTTアッセイを実施し、そして細胞培養物にM B P Cを加え、容量を $200\mu\text{l}$ とした。 10^{-7} から 10^{-4}M の濃度の[G P G R A F]₈-MLCは、この試験では細胞に対して毒性でなかった。他の結果は上記表3に示す。表に示されているように、I G P G R配列を含有するテトラデカペプチドMLCは毒性であるので、本発明で意図される治療用途には適切でない。

3. 抗原性-M B P Cに関する免疫原性試験

4匹のC57/B L 6ブラックマウスに $4\text{mg}/\text{ml}$ のM B P C. 3を $250\mu\text{l}$ (1mg)36日間毎日注射した。注射経路は腹腔内であった。血液試料は眼窩下眼穿刺で集めた。血液試料を 37°C で1時間、その後 4°C で一夜放置し、このようにして得られた上清液（血清試料）をペレットから分離した。血清はエリザ法で試験し、特異的な抗M B P C. 3抗体を検索した。

更に、2匹のニュージーランドウサギを[G P G R A F]₈-MLCで免疫化した： 1ml のP B S、p H 7. 4中 $400\mu\text{g}$ の[G P G R A F]₈-MLCを等量の完全フロイントアジュバントと混合し、0

日目に各ウサギの皮内に注射した。この方法を30、60、90及び120日目に不完全フロイントアジュバントを用いて皮下に反復注入した。血清はエリザ法で試験し、特異的な抗M B P C. 3抗体を検索した。本明細書に提示したデータは最後の血清試料(120+7日)のものである。

96ウェルの微量滴定プレート(Nunc、デンマーク国ロツツキルド)は、種々の濃度の[G P G R A F]₈-MLC($50\mu\text{l}$ のP B S中500から25ngの[G P G R A F]₈-MLC、p H 7. 4、ウェル当たり)を用いて 37°C で2時間被覆した。 $400\mu\text{l}$ のカゼイン($5\text{g}/100\text{ml}$)で飽和させた後、種々の血清希釈物を 37°C で2時間添加した。対照は免疫化していないウサギ及びマウスから得た血清であった。洗浄(5回)後、1:5000のパーオキシダーゼ標識ブタ抗ウサギI g G又は抗マウスI g G(Dakopatts、デンマーク国コペンハーゲン) $50\mu\text{l}$ を 37°C で1時間添加した。更に洗浄(5回)した後、 $100\mu\text{l}$ のオルトフェニレンジアミンを室温で暗

所で30分間添加した。反応は、4N硫酸50μlを添加して停止させ、492/620nmで光学密度(OD)比率を測定した。

下記表6～10はこれらの結果を記載し、表6は光学密度比率($\times 10^3$)を使用してウサギで達成された結果の要約を記載している。Moは10μg/mlのGPGRAFモノマーである。

表6

		1:10	血清	希釈	1:1000
[GPGRAF] μ g/ml					
10	ウサギA	+++	+	-	-
	ウサギB	+	-	-	-
5	ウサギA	+++	-	-	-
	ウサギB	+	-	-	-
1	ウサギA	+++	-	-	-
	ウサギB	+	-	-	-
0.5	ウサギA	+	-	-	-
	ウサギB	-	-	-	-

-: 光学密度(OD) < 0.2; +: OD = 0.2～0.4;

++: OD = 0.4～0.8; +++: OD > 0.8

表7 微量滴定プレートNo. 1

	S10	S10	S5	S5	S1	S1	S.5	S.5	Mo	Mo
M 10-2	1162	1199	1045	933	444	419	382	381	1224	1135
M 10-3	339	291	285	236	126	111	128	135	310	287
M 10-4	172	138	121	132	50	51	56	38	104	185
M ctrl	622	550	527	551	337	313	360	341	516	591
R ctrl	1062	1093	986	976	631	662	621	616	945	989
R 10-2	2000	2000	2000	2000	1280	1267	968	981	2000	2000
R 10-3	2000	2000	2000	2000	346	349	318	296	2000	2000
R 10-4	924	823	796	809	182	193	145	140	677	725

凡例: S 10 = $10 \mu\text{g}$ MBPC.3/ml; S 5 = $5 \mu\text{g}$ MBPC.3/ml

S 1 = $1 \mu\text{g}$ MBPC.3/ml; S.5 = $0.5 \mu\text{g}$ MBPC.3/ml

Mo = GPGRAFモノマー、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$

M 10-2 = $[10^{-2}]$ マウス; R 10-2 = $[10^{-2}]$ ウサギ

M ctrl = $[10^{-2}]$ 非免疫化マウス;

R ctrl = $[10^{-1}]$ 非免疫化ウサギ

表8 微量滴定プレートNo. 2

	S10	S10	S5	S5	S1	S1	S.5	S.5	Mo	Mo
M 10-2	1540	1457	1514	1344	381	429	315	841	1539	1575
M 10-3	334	291	263	273	54	65	47	82	342	335
M 10-4	132	188	88	97	15	17	13	83	95	126
M ctrl	490	464	385	231	241	289	235	851	482	500
R ctrl	437	429	386	345	214	185	117	153	376	395
R 10-2	2000	2000	2000	2000	1922	87	34	716	2000	2000
R 10-3	2000	2000	2000	2000	394	87	197	181	2000	1909
R 10-4	734	689	678	626	113	84	80	74	588	625

凡例: S 10 = $10 \mu\text{g}$ MBPC.3/ml; S 5 = $5 \mu\text{g}$ MBPC.3/ml

S 1 = $1 \mu\text{g}$ MBPC.3/ml; S.5 = $0.5 \mu\text{g}$ MBPC.3/ml

Mo = GPGRAFモノマー、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$

M 10-2 = $[10^{-2}]$ マウス; R 10-2 = $[10^{-2}]$ ウサギ

M ctrl = $[10^{-2}]$ 非免疫化マウス;

R ctrl = $[10^{-1}]$ 非免疫化ウサギ

表 9 微量滴定プレート No. 3

	S10	S10	S5	S5	S1	S1	S.5	S.5	Mo	Mo
M 10-2	639	664	636	630	241	200	204	198		
M 10-3	172	168	159	163	50	53	48	49		
M 10-4	85	84	83	84	22	22	22	21		
M ctrl	513	492	486	459	257	249	286	261		
R ctrl	833	238	222	213	92	92	91	88		
R 10-2	818	953	857	868	402	401	416	287		
R 10-3	342	328	323	314	168	150	148	155		
R 10-4	191	184	170	169	72	89	64	69		

凡例: S 10 = $10 \mu\text{g}$ MBPC.3/ml; S 5 = $5 \mu\text{g}$ MBPC.3/ml

S 1 = $1 \mu\text{g}$ MBPC.3/ml; S .5 = $0.5 \mu\text{g}$ MBPC.3/ml

Mo = GPGRAFモノマー、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$

M 10-2 = $[10^{-2}]$ マウス; R 10-2 = $[10^{-2}]$ ウサギ

M ctrl = $[10^{-2}]$ 非免疫化マウス;

R ctrl = $[10^{-1}]$ 非免疫化ウサギ

表 10 微量滴定プレート No. 4

	S10	S10	S5	S5	S1	S1	S.5	S.5	Mo	Mo
M 10-2	1454	1340	1233	1336	553	439	495	468	1231	1317
M 10-3	334	318	299	297	83	88	90	95	380	386
M 10-4	133	113	124	103	27	21	28	28	123	122
M ctrl	453	381	349	400	215	235	275	278	468	458
R ctrl	225	203	285	288	95	86	82	86	283	185
R 10-2	849	843	749	792	419	447	424	425	811	811
R 10-3	332	314	310	304	221	151	163	154	245	194
R ABU	263	279	255	251	105	101	134	128	214	218

凡例: S 10 = $10 \mu\text{g}$ MBPC.3/ml; S 5 = $5 \mu\text{g}$ MBPC.3/ml

S 1 = $1 \mu\text{g}$ MBPC.3/ml; S .5 = $0.5 \mu\text{g}$ MBPC.3/ml

Mo = GPGRAFモノマー、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$

M 10-2 = $[10^{-2}]$ マウス; R 10-2 = $[10^{-2}]$ ウサギ

M ctrl = $[10^{-2}]$ 非免疫化マウス;

R ctrl = $[10^{-1}]$ 非免疫化ウサギ

R ABU = $[10^{-2}]$ ウサギ、ペプチドAbu(非関連アミノ酸)

を有する

結果のいくつかで観察されたバックグラウンド反応性の量が高いことを考慮して、MBPC.1で免疫化した血清の非反応性を証明するために更に試験を実施した。

MBPC.1か又はMBPC.2で免疫化したウサギから得た血清はMBPC.1、MBPC.2、Mono.1 (MBPC.1のモノマー) 及び北アメリカ人／ヨーロッパ人のコンセンサスV3配列(V3 Cons、又はCs)と結合する能力についてエリザ法で試験した。

図6Aは、MBPC.2で免疫化したウサギから得た血清がMBPC.2及びV3 Consを顕著に認識したが、MBPC.1又はその対応するモノマーペプチドに対する反応性は観察されなかったことを示している。図6Bは、MBPC.1で免疫化したウサギから得た血清がMBPC.1 (ウサギAから得た血清の弱い反応性を除く)、MB

PC.2、V3 Cons又はMono.1に対して反応しなかったことを示している。陰性対照として使用した前免疫血清も同様にMBPC. V3 Cons又はMono.1のいずれに対しても反応しなかった。

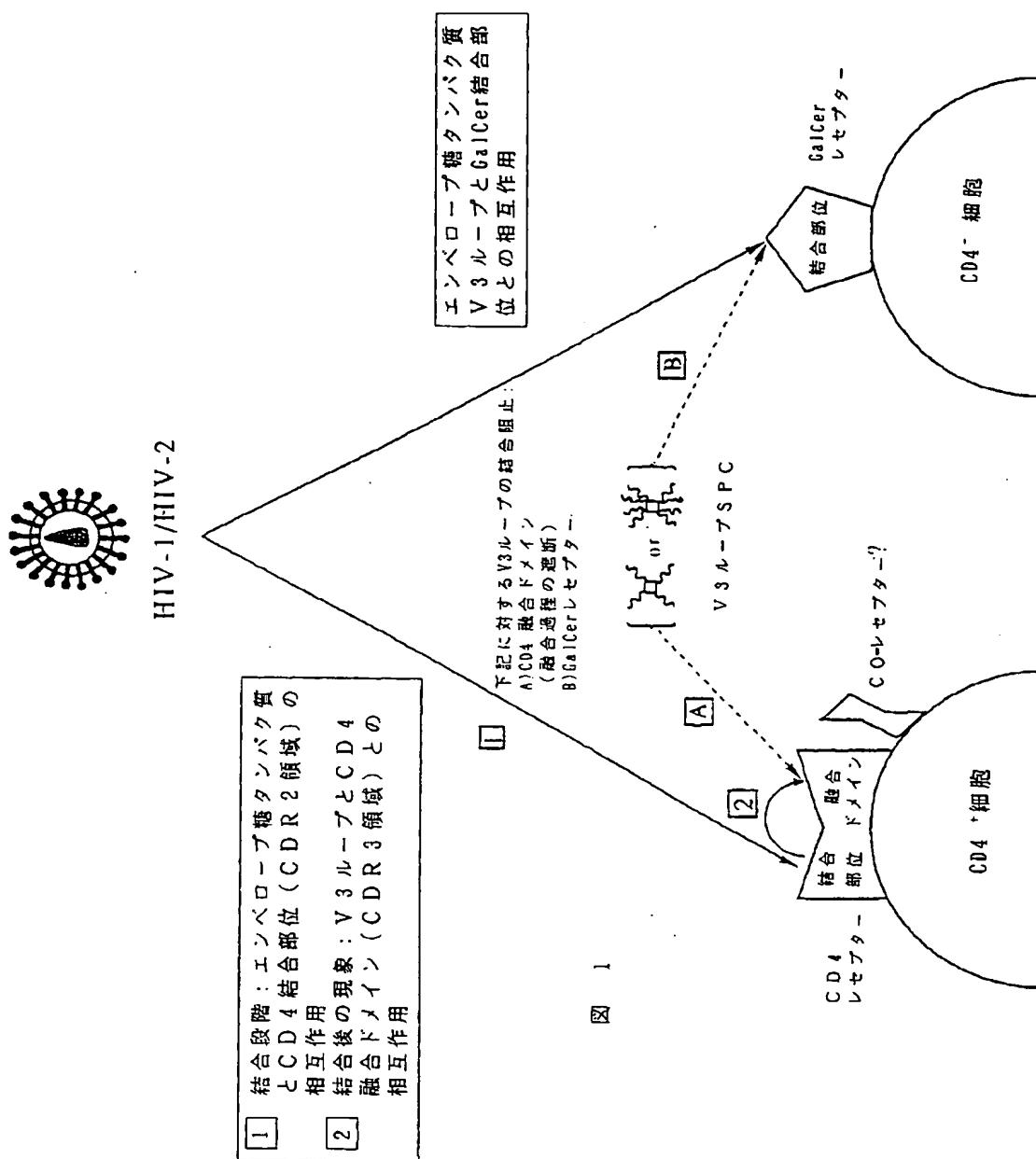
もう1つの実験セットで、MBPC.1又はMBPC.2のどちらかで免疫化したウサギから得た血清を種々の濃度のMBPC.1、MBPC.2及びV3 Consに対して試験した (1/100及び1/1000希釈)。図7A、7B及び7Cは、MBPC.2で免疫化したウサギから得た血清がMBPC.2及びV3 Consに対して投与量依存性態様で反応したことを明白に示している。MBPC.1に対する反応性は検出されなかった。対照的に、MBPC.1で免疫化したウサギから得た血清はMBPC.2に対しては反応しなかったが、MBPC.1に対しては弱く反応した (MBPC.1に対するウサギAから得た血清の反応性は弱く、ウサギBから得た血清は反応性がなかったことに注意されたい)。興味深いことに、これら後者の血清はモノマーV3 Cons、即ちgp120に存在するコンセンサス配列に似せた34個アミノ酸の直鎖エピトープとは反応しなかった。

これらの結果は、MBPC.1、即ち短いV3 MBPCはウサギで顕著な抗体応答を誘発しなかったが、MBPC.2、即ち最も長いV3 ペプチド構築物は上記の

ような応答を誘発したことを示している。これらの観察は、M B P C. 1とH I V - 1 感染患者血清との免疫反応性の結果と一致している。

10^{-3} Mを反復注入したマウスでは、非常に弱い抗体力値を1:100希釈の血清で時々検出することができ、そしてより低い血清希釈では抗体は本質的に検出することができなかつた。ウサギでは、1:100血清希釈の1羽の動物で抗体を検出できる。他の全ての血清希釈物では、抗体の力値は対照動物で得られた力値に匹敵している。このような弱い抗原性は、本発明のM B P Cが有効な抗体応答を引き出し得る抗原（これが、これまでに知られているペプチド構築物の用途である）として使用される可能性を有していないことを示している。実際、本発明のM B P Cの意図された治療濃度は約 10^{-6} Mであり、この濃度では抗体応答は期待されない。しかしながら、抗原性がないものとすれば、 10^{-3} MまでのM B P Cを投与することができる。

【図1】



【図2】

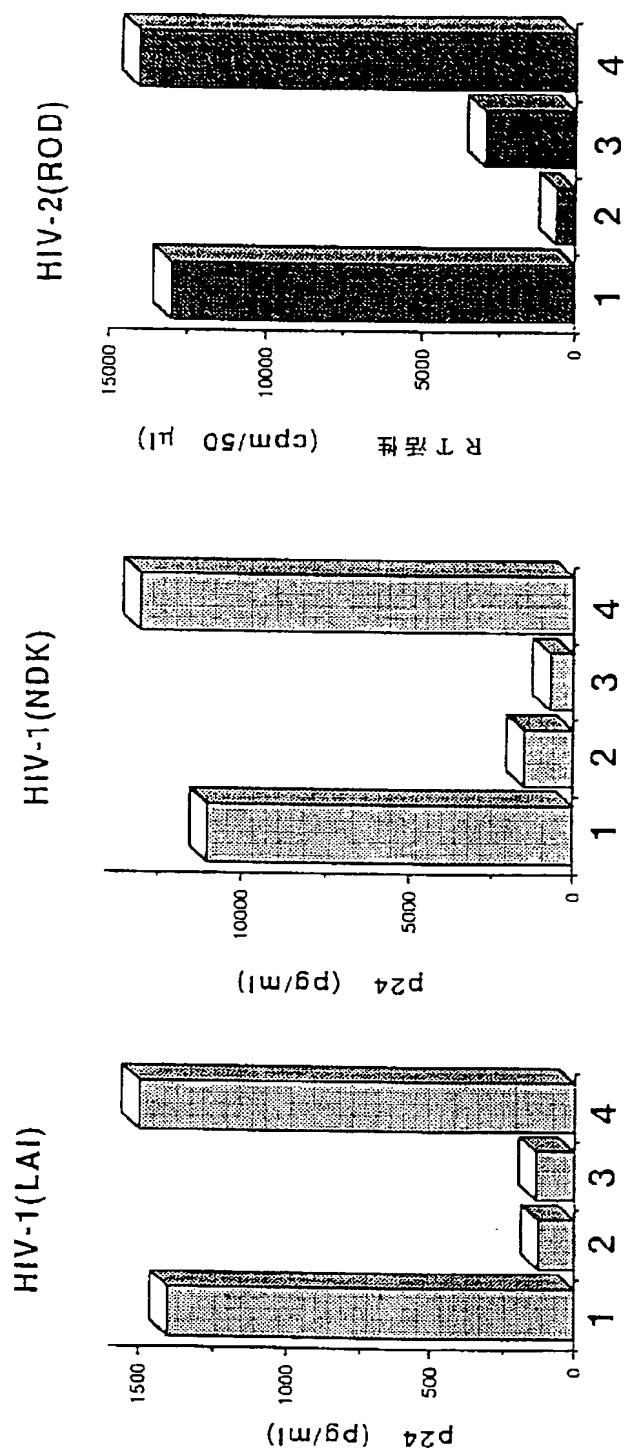


図2

【図3】

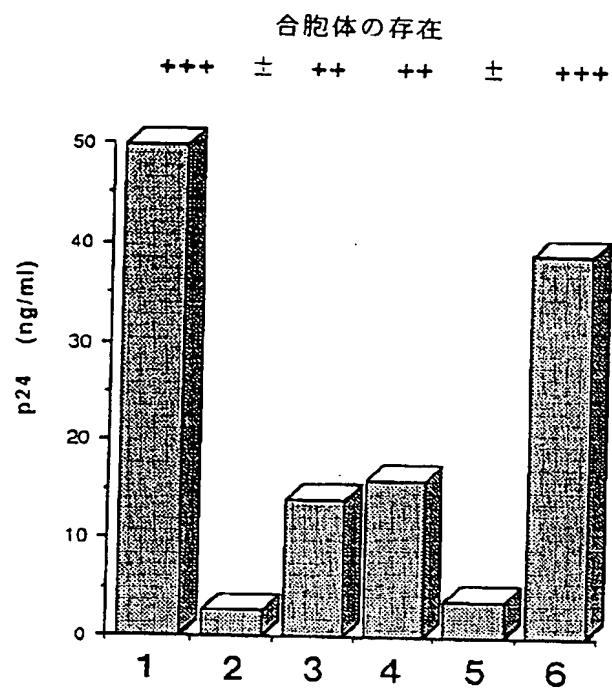


図 3

【図4】



図 4 A

図 4 B

【図5】

図 5 B

GalCerに対するgp120の結合

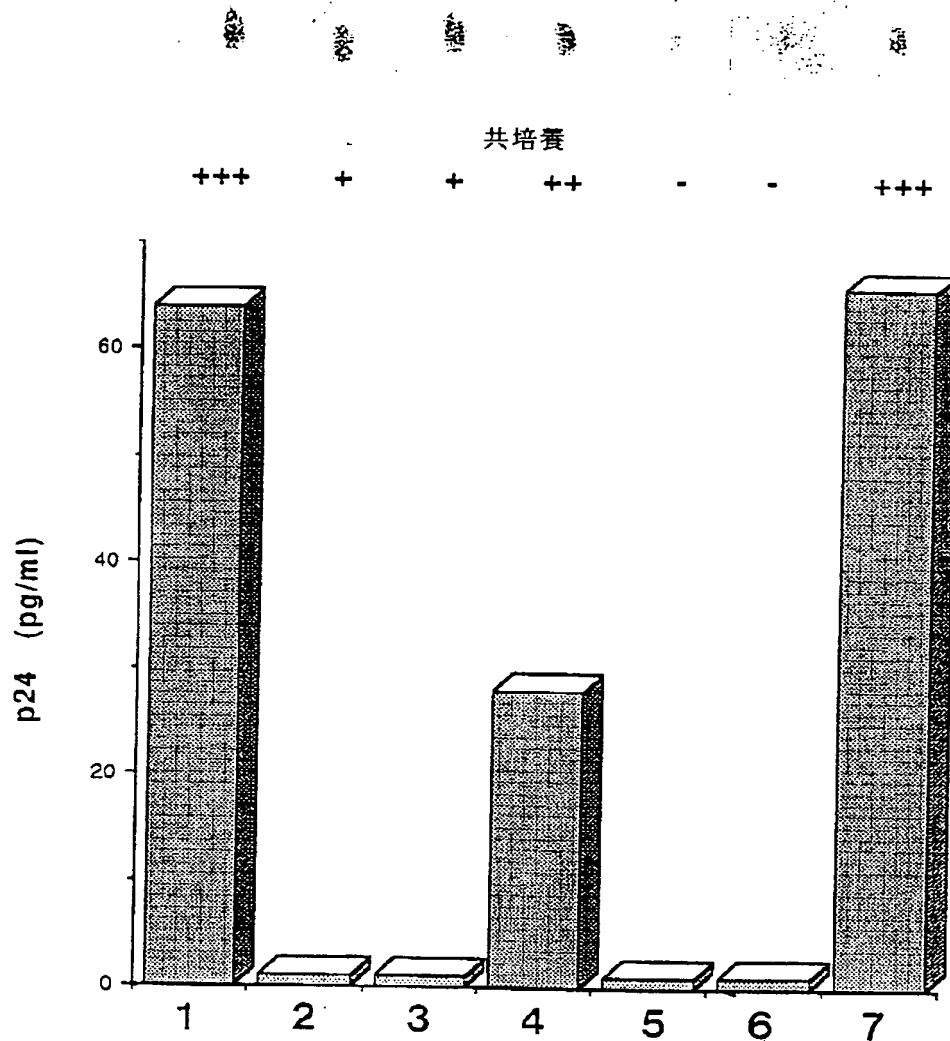
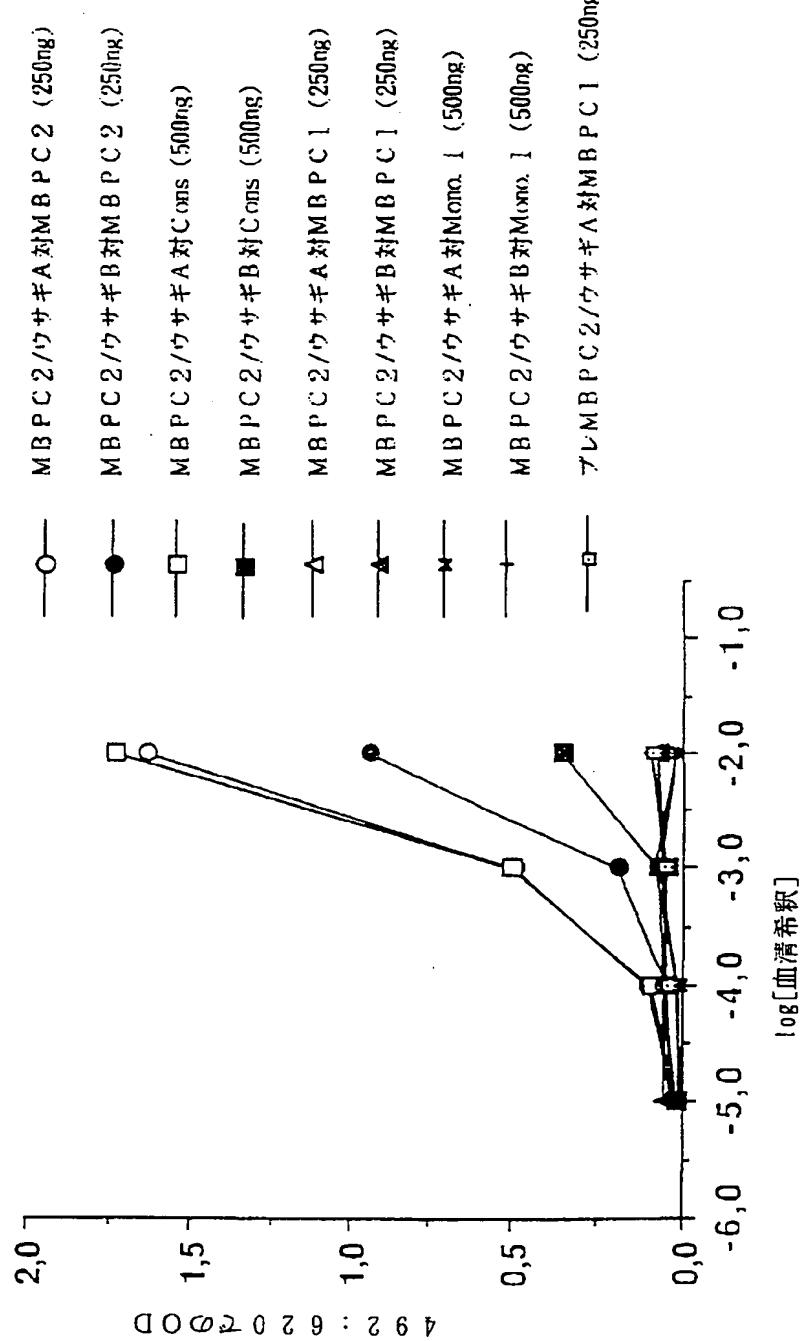


図 5 A

【図6】

図 6 A

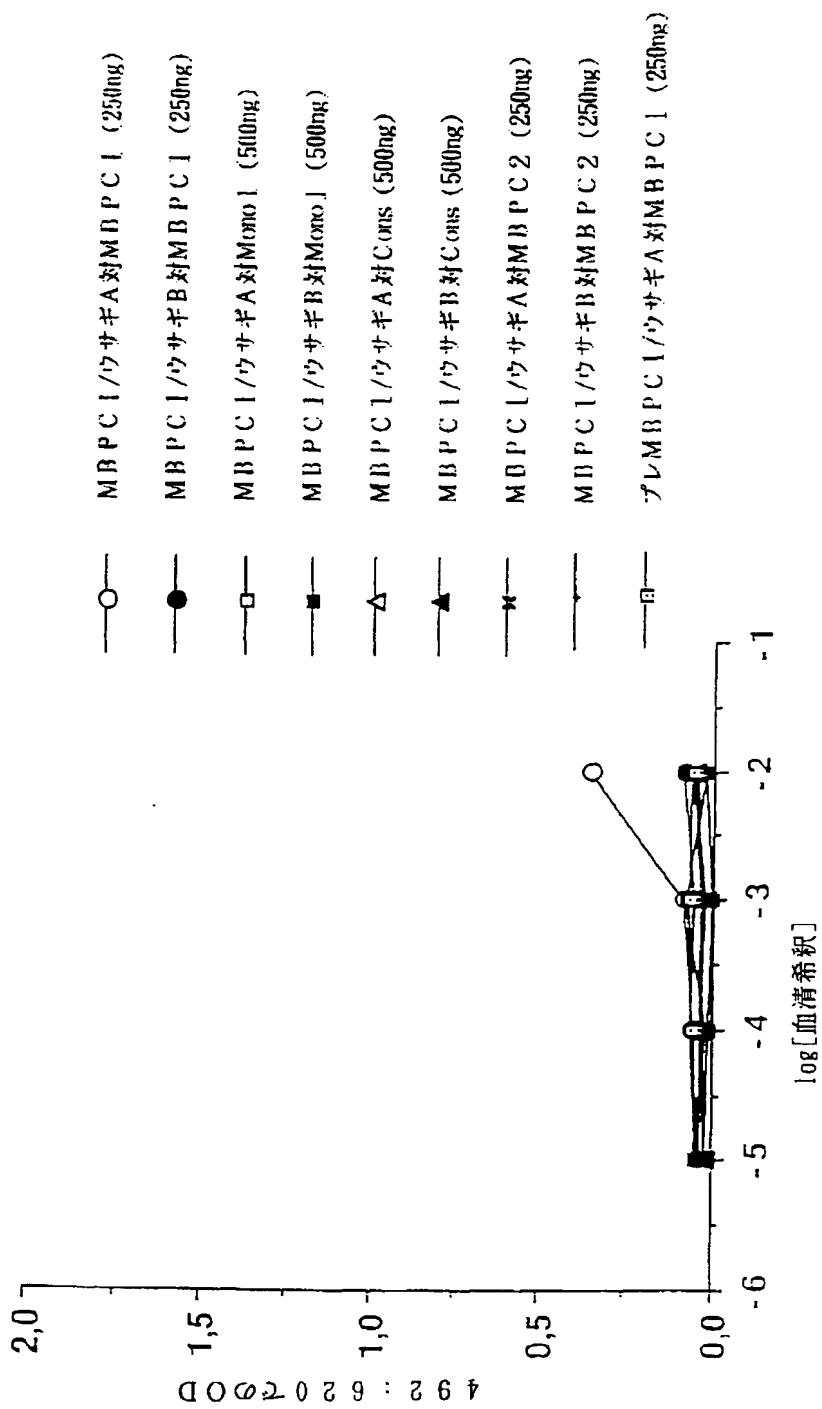
MOPC 2、MBPC 1、Mono. I、Csに対する
抗MBPC 2抗体の免疫反応性



【図 6】

MBPC1、Mono 1、Cs、MBPC2に対する
抗MBPC1抗体の免疫反応性

図 6 B



【図7】

図 7 A

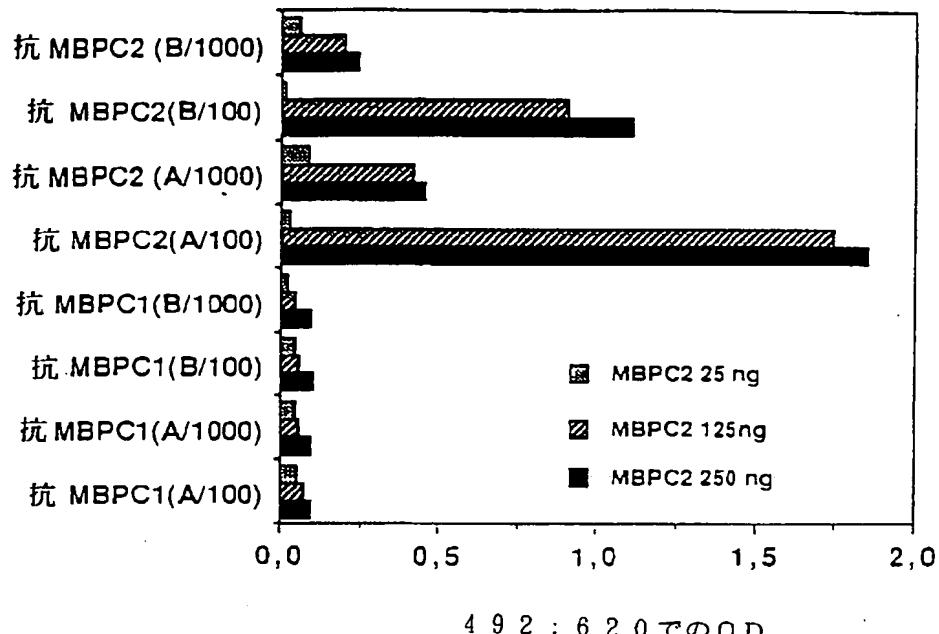
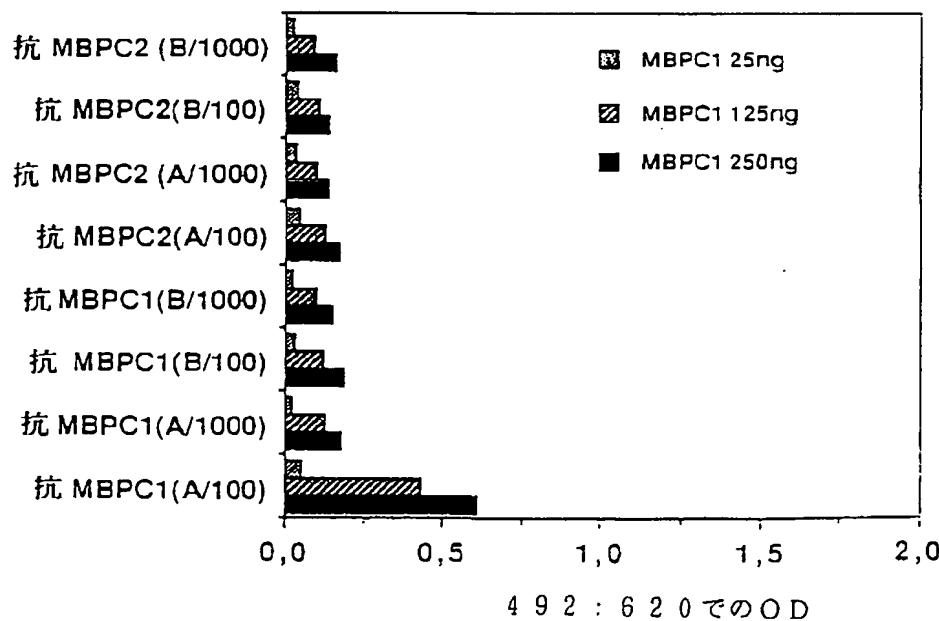
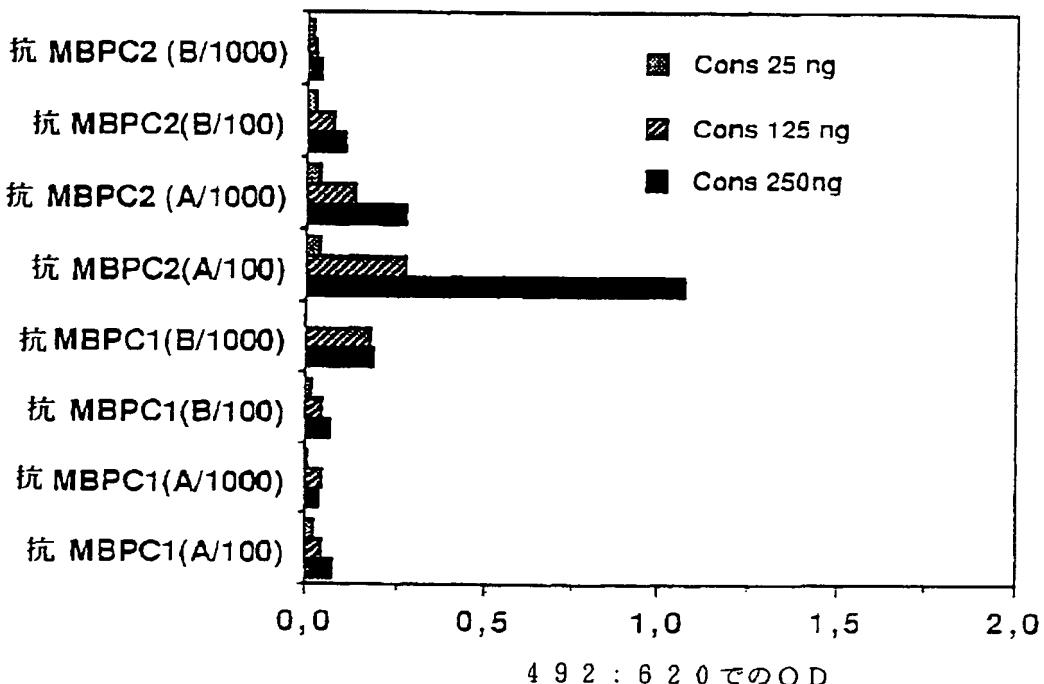


図 7 B



【図7】

図 7 C



【手続補正書】特許法第184条の8

【提出日】1995年11月21日

【補正内容】

請求の範囲

1. 4から16個までのペプチドが結合しているコアマトリックスを含む多分岐ペプチド構築物であって、その際に記各ペプチドは0から4個までのアミノ酸残基が先行しており、2から4個までのアミノ酸残基が後に続いているアミノ酸配列G P G Rを含んでいるが、本質的にアミノ酸配列I G P G R又はI X X G P G R（式中、Xはアミノ酸残基である）を有していない多分岐ペプチド構築物。
2. 各ペプチドが同一である請求項1に記載のペプチド構築物。
3. 各ペプチドがG P G R A Fである請求項1に記載のペプチド構築物。
4. 8又は16個のペプチドG P G R A Fが存在している請求項3に記載のペプチド構築物。
5. コアマトリックスがリジン残基を含むものである請求項1～4のいずれか1項に記載のペプチド構築物。
6. コアマトリックスとペプチドの間にスペーサーが存在している請求項1～5のいずれか1項に記載のペプチド構築物。
7. すべてのペプチド又はいくつかのペプチドが1個又は複数個の右旋性アミノ酸残基を含んでいる請求項1に記載のペプチド構築物。
8. 請求項1～7のいずれか1項に記載の多分岐ペプチド構築物を製薬的に許容可能な希釈剤又は担体と混合して含んでいる医薬品。
9. 2から64個までのペプチドが結合しているコアマトリックスを含む多分岐ペプチド構築物であって、その際に記各ペプチドは0から4個までのアミノ酸残基が先行しており、2から4個までのアミノ酸残基が後に続いているアミノ酸配列G P G Rを含んでいるが、本質的にアミノ酸配列I G P G R又はI X X G P G R（式中、Xはアミノ酸残基である）を有していない多分岐ペプチド構築物。
10. 4から32個までのペプチドが結合しているコアマトリックスを含む請求項9に記載のペプチド構築物。

11. 各ペプチドが同一である請求項9又は10に記載のペプチド構築物。
12. 各ペプチドがGPGRAFである請求項9又は10に記載のペプチド構築物。
13. 8又は16個のペプチドGPGRAFが存在している請求項12に記載のペプチド構築物。
14. コアマトリックスがリジン残基を含むものである請求項9～13のいずれか1項に記載のペプチド構築物。
15. コアマトリックスとペプチドの間にスペーサーが存在している請求項9～14のいずれか1項に記載のペプチド構築物。
16. ペプチドがペプチド類似体である請求項9に記載のペプチド構築物。
17. すべてのペプチド又はいくつかのペプチドが1個又は複数個の右旋性アミノ酸残基を含んでいる請求項9に記載のペプチド構築物。
18. HIVウイルスの表面エンベロープ糖タンパク質gp120のV3ループから誘導される、アミノ酸配列GPGRを含んでいるが、アミノ酸配列IGPGR又はIXXGPR（式中、Xはアミノ酸残基である）を有していない、2から64個までのペプチドが結合しているコアマトリックスを含む多分岐ペプチド構築物であって、該多分岐ペプチド構築物は10⁻⁴モル未満の血清濃度で非免疫原性であり、結合したCD4⁺/GalCer⁻及びCD4⁻/GalCer⁺細胞の両方でHIVウイルスの感染性を阻止できる多分岐ペプチド構築物。
19. 4から16個までのペプチドが結合しているコアマトリックスを含む請求項18に記載のペプチド構築物。
20. 請求項9～19のいずれか1項に記載の多分岐ペプチド構築物を製薬的に許容可能な希釈剤又は担体と混合して含んでいる医薬品。
21. 各ペプチドは0から4個のアミノ酸残基が先行しており、2から4個のアミノ酸残基が後に続いているアミノ酸配列GPGRを含んでいる、2から64個までのペプチドが結合しているコアマトリックスを含む多分岐ペプチド構築物の、HIV感染治療用の医薬品を製造するための用途。

22. 各ペプチドは0から4個のアミノ酸残基が先行しており、2から4個のアミノ酸残基が後に続いているアミノ酸配列G P G Rを含んでいる、2から64個までのペプチドが結合しているコアマトリックスを含む多分岐ペプチド構築物を患者に投与することを含むH I V感染の治療方法。

23. 請求項9～19のいずれか1項に記載の多分岐ペプチド構築物を患者に投与することを含むH I V感染の治療方法。

24. 請求項20に記載の医薬品を患者に投与することを含むH I V感染の治療方法。

25. 各ペプチドは0から4個のアミノ酸残基が先行しており、2から4個のアミノ酸残基が後に続いているアミノ酸配列G P G Rを含んでいるが、本質的にアミノ酸配列I G P G R又はI X X G P G R（式中、Xはアミノ酸残基である）を有していない、2から64個までのペプチドが結合しているコアマトリックスを含む多分岐ペプチド構築物の製造方法において、樹脂上でペプチド鎖を固相で段階的に延長し、続いて該樹脂から多分岐ペプチド構築物を開裂させることを特徴とする方法。

26. 樹脂が4-オキシメチルフェニルアセトアミドメチルコポリ（スチレンー1%ジビニルベンゼン）である請求項25に記載の方法。

27. ヒドロキシベンゾトリアゾール活性エステル（Boc-アミノ酸-O Bt）との系統的二重カップリングを含むBoc/ベンジル法を使用する請求項25又は請求項26に記載の方法。

28. 樹脂からの開裂が無水フッ化水素を用いて0℃で実施される請求項25～27のいずれか1項に記載の方法。

29. 製造されるペプチド構築物が、コアマトリックスに結合した4から32個までのペプチドが存在している構築物である請求項25～28のいずれか1項に記載の方法。

30. 製造されるペプチド構築物が、各ペプチドが同一である構築物である請求項25～29のいずれか1項に記載の方法。

31. 製造されるペプチド構築物が、各ペプチドがG P G R A Fである構築物

である請求項25～30のいずれか1項に記載の方法。

32. 製造されるペプチド構築物が、8個又は16個のペプチドGPGRAFが存在している構築物である請求項31に記載の方法。

33. 製造されるペプチド構築物が、コアマトリックスがリジン残基を含んでいる構築物である請求項25～32のいずれか1項に記載の方法。

34. 製造されるペプチド構築物が、コアマトリックスとペプチドの間にスペーサーが存在している構築物である請求項25～33のいずれか1項に記載の方法。

35. 製造されるペプチド構築物が、ペプチドがペプチド類似体である構築物である請求項25～28のいずれか1項に記載の方法。

36. 製造されるペプチド構築物が、すべてのペプチド又はいくつかのペプチドに1個又は複数個の右旋性アミノ酸残基を含んでいる構築物である請求項25～28のいずれか1項に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inten. Application No.
PCT/GB 94/01992

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07K14/16 A61K38/16		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WD,A,93 03766 (REPLIGEN CORPORATION) 4 March 1993 see the whole document ---	10-15
P,X	J.VIROLOGY, vol.68, no.9, September 1994 pages 5714 - 5720 N.YAHI ET AL 'Multibranched V3 peptides inhibit HIV infection in human lymphocytes and macrophages' see the whole document ---	1-7, 10-25 -/-
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
<p>* Special categories of cited documents :</p> <p>'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>'E' earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>'A' document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 14 December 1994	Date of mailing of the international search report 30.12.94	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 3818 Patentstaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Telex 31 651 epo nl Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Groenendijk, M	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No.
PCT/GB 94/01992

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
P,X	<p>C.R.ACAD. SCI. SER. III, vol.316, no.11, November 1993 pages 1381 - 1387</p> <p>J.FANTINI ET AL 'Multibranched peptides based on the HIV-1 V3 loop consensus motif inhibit HIV-1 and HIV-2 infection in CD4+ and CD4- cells.' see the whole document</p> <p>---</p>
A	<p>AIDS RESEARCH AND HUMAN RETROVIRUSES, vol.9, no.7, July 1993 pages 581 - 587</p> <p>G.P.ALLAWAY ET AL 'Synergistic inhibition of HIV-1 envelope-mediated cell fusion by CD4-based molecules in combination with antibodies to gp120 or gp41' see the whole document</p> <p>---</p>
A	<p>BIOCHEMISTRY., vol.32, no.11, 23 March 1993, EASTON, PA US</p> <p>pages 2763 - 2770</p> <p>J.M.SABATIER ET AL 'PO5, a new leurotoxin I-like scorpion toxin.'</p> <p>see page 2764</p> <p>---</p>
A	<p>SCIENCE, vol.232, 18 April 1986, LANCASTER, PA US</p> <p>pages 341 - 347</p> <p>B.MERRIFIELD 'SOLID PHASE SYNTHESIS' see the whole document</p> <p>-----</p>

Form PCT/ISA/11B (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family membersInternational Application No
PCT/GB 94/01992

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9303766	04-03-93	NONE	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(81) 指定国 E P (A T, B E, C H, D E,
D K, E S, F R, G B, G R, I E, I T, L U, M
C, N L, P T, S E), O A (B F, B J, C F, C G
, C I, C M, G A, G N, M L, M R, N E, S N,
T D, T G), A M, A T, A U, B B, B G, B R,
B Y, C A, C H, C N, C Z, D E, D K, E E, E
S, F I, G B, G E, H U, J P, K G, K P, K R
, K Z, L K, L R, L T, L U, L V, M D, M G,
M N, N L, N O, N Z, P L, P T, R O, R U, S
E, S I, S K, T J, T T, U A, U Z, V N

(72) 発明者 ヤヒ, ヌアラ

フランス国 マルセイユ 13009, ブルヴ
アール ド ルドン, 83番, ラ ルヴィエ
ール, パティマン デー2

(72) 発明者 フアニュイエ, エマニュエル

フランス国 ラ ヴァレット ドウ ヴア
ール 83160, アヴェニュー トルテル,
707番

(72) 発明者 マブルーク, カメル

フランス国 マルセイユ 13300, ブルヴ
アール ジ. デスプラセ, 7番

(72) 発明者 グルックマン, ジャン・クロード

フランス国 パリ 75014, ブルヴァール
ドウ ポン・ロワイヤル, 70番

(72) 発明者 ヴアン リエショータン, ジュルファース

フランス国 エクス アン プロヴァンス
13100, ヴアル ド ラ トルス ダル
タニヤン ▲ I I ▼ (番地なし)

(72) 発明者 ロシャ, エルヴ

フランス国 ミメ 13105, シュマン デ
サンジェオン (番地なし)